

For 2

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/88172 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 1/00,
C25B 3/04, 9/00, C12M 1/00, C12P 7/22

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05601

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Mai 2001 (16.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 24 314.2 17. Mai 2000 (17.05.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(71) Anmelder (nur für US): STECKHAN, Christine, Karla
(Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg
26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Uwe (Erbe
des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26,
53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Antje (Erbin
des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26,
53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Heike (Erbin
des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26,
53340 Meckenheim (DE).

(72) Erfinder: STECKHAN, Eberhard (verstorben).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMID, Andreas

[DE/CH]; Im oberen Boden 60, CH-8049 Zürich (CH).
HOLLMANN, Frank [DE/CH]; Fronwaldstr. 94,
CH-8046 Zürich (CH). HAUER, Bernhard [DE/DE];
Merowingerstr. 1, 67136 Fussgönheim (DE). ZELINSKI,
Thomas [DE/DE]; Ziegeleistr. 81, 67122 Altrip (DE).

(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Ludwigsplatz 4,
67059 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD COMPRISING THE INDIRECT ELECTROCHEMICAL REGENERATION OF NAD(P)H

(54) Bezeichnung: VERFAHREN, UMFASSEND DIE INDIREKTE ELEKTROCHEMISCHE REGENERATION VON NAD(P)H

(57) Abstract: The invention relates to a method comprising the indirect electrochemical regeneration of NAD(P)H in enzymatic substrate reactions, that are, for example, catalyzed by monooxygenases. The invention especially relates to a method for the electroenzymatic production of 2,3-dihydroxyphenyl derivatives that is catalyzed by the enzyme 2-hydroxybiphenyl-3-monooxygenase, while at the same time the NAD⁺ produced by reductive oxygen separation is electrochemically reduced.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren, umfassend die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD(P)H bei enzymatischen Substratumsetzungen, welche beispielsweise durch Monooxygenasen katalysiert werden. Gegenstand ist insbesondere ein Verfahren zur elektroenzymatischen Herstellung von 2,3-Dihydroxyphenylderivaten, welches durch das Enzym 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase katalysiert wird, und wobei gleichzeitig das durch reduktive Sauerstoffspaltung gebildete NAD⁺ elektrochemisch reduziert wird.

WO 01/88172 A1

Verfahren, umfassend die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD(P)H

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren, umfassend die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD(P)H aus NAD(P)⁺, welches beispielsweise bei der enzymkatalysierten reduktiven Sauerstoffspaltung anfällt. Das erfindungsgemäße elektrochemische Regenerationsverfahren ist insbesondere anwendbar im Rahmen elektroenzymatischer, NAD(P)H verbrauchender Umsetzungen, insbesondere oxidativer enzymatischer Umsetzungen von Substraten durch Monooxygenasen. Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung ein

10 stoffspaltung anfällt. Das erfindungsgemäße elektrochemische Regenerationsverfahren ist insbesondere anwendbar im Rahmen elektroenzymatischer, NAD(P)H verbrauchender Umsetzungen, insbesondere oxidativer enzymatischer Umsetzungen von Substraten durch Monooxygenasen. Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung ein

15 elektroenzymatisches Verfahren zur Monooxygenase-katalysierten Herstellung von 2,3-Dihydroxy-Phenylderivaten.

Biokatalysierte Reaktionen gewinnen sowohl in der organischen Laborsynthese als auch in zahlreichen industriellen Anwendungen immer mehr an Bedeutung. Insbesondere die gewöhnlich hohen Regio- und Stereoselektivitäten enzymatischer Umsetzungen unter gleichzeitig milden Bedingungen und hohen Ausbeuten machen sie zu attraktiven Werkzeugen in der Synthesepaltung. Im Gegensatz zu

20 Laborsynthese als auch in zahlreichen industriellen Anwendungen immer mehr an Bedeutung. Insbesondere die gewöhnlich hohen Regio- und Stereoselektivitäten enzymatischer Umsetzungen unter gleichzeitig milden Bedingungen und hohen Ausbeuten machen sie zu attraktiven Werkzeugen in der Synthesepaltung. Im Gegensatz zu

25 den hydrolytischen Enzymen, die bereits vielfältige Verwendung finden, ist der Einsatz von Redoxenzymen für enantioselektive Reduktionen und chemo-, regio- und enantioselektive Oxidationen trotz ihres großen synthetischen Potenzials noch nicht sehr weit verbreitet. Grund dafür ist vor allem das bisher nicht

30 zufriedenstellend gelöste Problem einer effektiven Cofaktorregeneration. Neben den etablierten Verfahren der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung [1a,b,c,d] wurden inzwischen auch elektrochemische Methoden entwickelt und auf NAD(P)⁺- und NAD(P)H-abhängige Enzyme angewandt [2a,b,c]. Der

35 Vorteil der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung besteht darin, daß lediglich das Produktionsenzym benötigt wird und sich somit die häufig schwierige Optimierung eines Doppel-Enzym-Systems erübrigt. Darüber hinaus kann auf ein Cosubstrat verzichtet werden.

40 Monooxygenasen besitzen eine hohe synthetische Bedeutung, da sie in der Lage sind, Sauerstofffunktionen regio- und stereoselektiv in ihre Substrate einzubauen. Dafür benötigen sie molekularen Sauerstoff, dessen O-O-Bindung reduktiv unter Bildung von Wasser

45 gespalten wird [3a,b]. Die nativen Cofaktoren der Monooxygenasen NADH oder NADPH liefern dazu die notwendigen Reduktionsäquivalente. Die bisherigen in vitro-Verfahren mit

Monooxygenasen als Produktionenzyme beruhen auf einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung unter Verwendung der Formiat-Dehydrogenase [4a,b] (für NADH bzw. NADPH) sowie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase [5] (für NADPH).

5

Reipa et al. beschreiben in [10] ein Verfahren zur elektrochemischen Regeneration von Putidaredoxin, dem natürlichen Redoxpartner der Cytochrom CYP 101-Monooxygenase (E.C.1.14.15.1). Hierzu wird die Verwendung einer speziellen Antimon-dotierten

- 10 Zinnoxidelektrode vorgeschlagen, welche zur Putidaredoxin-Reduktion geeignet ist.

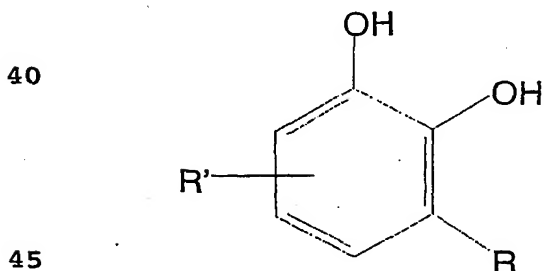
Held et al. beschreiben in [8] die biokatalytische Produktion von 3-Phenylcatechol unter Verwendung ganzer Zellen von Escherichia coli JM 101 (pHDT 461). Dieser rekombinante Mikroorganismus ist zur Produktion des Enzyms 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase ausgelegt. Eine elektrochemische Regeneration von verbrauchtem NADH in in diesem Zusammenhang nicht erforderlich, da der Cofaktor durch das enzymatische System der intakten E.

- 20 coli-Zellen wieder regeneriert wird.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein enzymfreies, selektives und effektives Verfahren zur indirekten elektrochemischen NAD(P)H-Regenerierung zu entwickeln, welches
25 z.B. gekoppelt mit Monooxygenasen zur oxidativen Umsetzung von Substraten unter reduktiver Sauerstoffspaltung geeignet ist. Eine weitere Aufgabe bestand in der Bereitstellung eines Verfahrens, das die enzymatische, Monooxygenase-katalysierte Synthese von 2,3-Dihydroxyphenyl-Verbindungen, wie 2,3,-Dihydroxybiphenyl,
30 unter indirekten elektrochemischen NAD(P)H-Regenerierung ermöglicht.

Kurze Beschreibung der Erfindung

- 35 Diese Aufgaben wurden gelöst durch Bereitstellung eines elektroenzymatischen Verfahrens zur Herstellung von 2,3-Dihydroxyphenylderivaten der allgemeinen Formel I



(I)

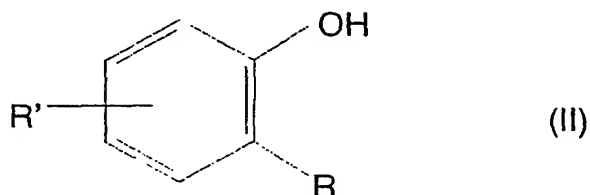
3

worin R für gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiertes Phenyl, C₁-C₆-Alkyl, Halogen oder CN steht; und R' für H oder OH steht; wobei man bei diesem Verfahren

5

a) eine Monohydroxyphenyl-Verbindung der allgemeinen Formel II

10



worin R und R' die oben angegebenen Bedeutungen besitzen, mit 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase (Hbpa) (E.C. 1.14.13.44) in Gegenwart von NADH und Sauerstoff umgesetzt; und

b) das gebildete NAD⁺ elektrochemisch zu NADH reduziert.

Die Aufgaben werden außerdem gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur NAD(P)H-Regeneration bei einer NAD(P)H-verbrauchenden oxidativen enzymatischen Umsetzung eines Substrates, bei dem man eine NAD(P)H-verbrauchende oxidative enzymatische Umsetzung eines oxidierbaren Substrates in Gegenwart von NAD(P)H und vorzugsweise unter Sauerstoffverbrauch durchführt, und das bei der Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺ elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert. Beispielsweise kann man eine NAD(P)H-abhängige Monooxygenase (aus der Klasse E.C. 1.14.--) mit dem oxidierbaren Substrat in Gegenwart von NAD(P)H und in Anwesenheit von Sauerstoff inkubieren und das bei reduktiver Sauerstoffspaltung und Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺ elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert.

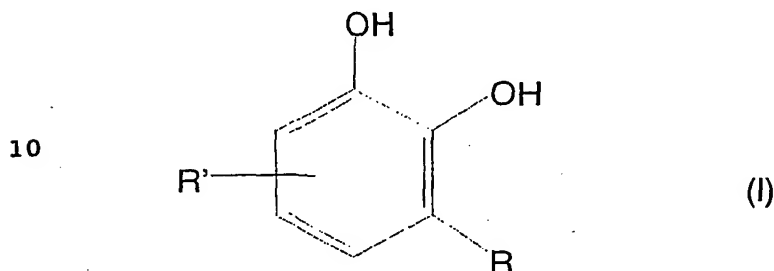
Die vorliegende Erfindung erlaubt erstmalig die enzymungebundene, indirekte elektrochemische Regeneration von NADH bzw. NADPH im Rahmen von Sauerstoff verbrauchenden, z.B. Monooxygenase-katalysierter Reaktionen. Aufgrund der indirekten elektrochemischen Cofaktorregeneration ist eine kontinuierliche Substratumsetzung möglich.

40

Eine "indirekte" elektrochemische Regeneration von NAD(P)H im Sinne der vorliegenden Erfindung ist gegeben, wenn der Cofaktor über einen geeigneten Redoxkatalysator regeneriert wird, welcher die zur Reduktion erforderlichen Elektronen von der Kathode auf den oxidierten Cofaktor überträgt.

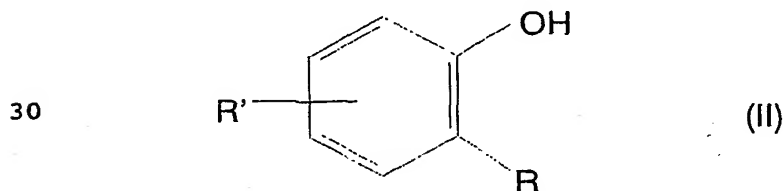
Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein
elektroenzymatisches Verfahren zur Herstellung von
5 2,3-Dihydroxyphenylderivaten der allgemeinen Formel I



15 worin R für gegebenenfalls ein oder mehrfach, z.B. durch Halogen, wie z.B. F, Cl, Br oder J, CN oder OH, insbesondere OH, substituiertes Phenyl; für C₁-C₆-Alkyl, wie z.B. Methyl, Ethyl, n- oder i- Propyl, n-, i- oder t-Butyl, sowie n-Pentyl oder n-Hexyl
20 und jeweils die verzweigten Analoga davon; für Halogen, wie z.B. F, Cl, Br oder J; oder für CN steht; und R' für H oder OH steht, wobei R' in m- oder p-Position, vorzugsweise p-Position zur 2-Hydroxygruppe des Phenylrings steht, und wobei man

25 a) eine Monohydroxyphenyl-Verbindung der allgemeinen Formel II

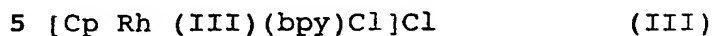


worin R und R' die oben angegebenen Bedeutungen besitzen,
35 mit 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase (HbpA) (E.C. 1.14.13.44) in Gegenwart von NADH und Sauerstoff umgesetzt; und

b) das gebildete NAD⁺ elektrochemisch zu NADH reduziert.

40 Bevorzugt führt man die elektrochemische NAD⁺-Reduktion in Gegenwart eines Hydridorhodium-Redoxkatalysators durch, der kathodisch herstellbar und regenerierbar ist. Der Redoxkatalysator ist dabei ein vorzugsweise löslicher Rhodiumkomplex, der bei einem Kathodenpotenzial im Bereich von
45 -650 bis -800 mV, gemessen gegen Ag/AgCl(gesättigt) (pH=6-9; T=20-60°C, insbesondere etwa 20 bis 35°C, wie z.B. etwa 30°C) elektrochemisch in den Hydridorhodium-Komplex überführbar ist.

Besonders bevorzugt verwendet man zur Durchführung der HbpA-katalysierten Reaktion einen Rhodium-Komplex der allgemeinen Formel III

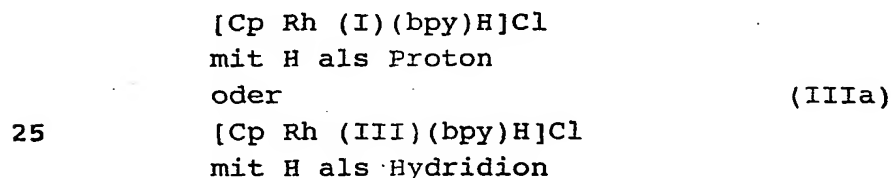


worin

- Cp für Cyclopentadienyl oder Pentamethylcyclopentadienyl steht und
- 10 bpy für 2,2'-Bipyridyl steht, wobei jeder der Pyridylringe gegebenenfalls ein- oder mehrfach, insbesondere einfach, durch eine Donorgruppe substituiert ist, wobei die Donorgruppe ausgewählt ist unter Methyl, Methoxy und Acetamido. Bevorzugt kann jeder Pyridylring einen dieser Substituenten in 4- oder
- 15 5-Position tragen. Insbesondere sind die Pyridylringe mit gleichen Donorgruppen substituiert.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Beteiligung der HbpA-Katalyse wird der Rhodium-Komplex der Formel III kathodisch

20 zu einem Hydridorhodium-Komplex der Formel IIIa



worin Cp und bpy die oben für Formel III angegebenen Bedeutungen besitzen,

30 reduziert, welcher dann zur NAD^+ -Reduktion befähigt ist.

Die erfindungsgemäße Herstellung der Dihydroxyverbindungen der allgemeinen Formel I wird bevorzugt unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 35 a) Substratkonzentration (Verbindung der Formel II): 0,01 bis 50 mM, insbesondere 0,1 bis 4 mM;
- b) NAD^+ Konzentration: 0,01 bis 5 mM, insbesondere 0,01 bis 0,5 mM;
- c) Rhodium-Komplex-Konzentration: 1 μM bis 5 mM, insbesondere
- 40 5 μM bis 0,5 mM;
- d) HbpA-Konzentration: 1 bis 5000 U/l, insbesondere 10 bis 1000 U/l;
- e) FAD-Konzentration: 0 bis 200 μM , insbesondere 0 bis 20 oder 1 bis 20 μM ;
- 45 f) Catalase-Konzentration: 0 bis 1×10^7 U/l;
- g) pH: 4 bis 9, insbesondere 6 bis 7,5.

- h) Temperatur: 10 bis 40°C, insbesondere 20 bis 35°C oder etwa 30°C
- i) Kathodenpotenzial: -600 bis -900mV, insbesondere -650 bis -800 mV
- 5 j) Sauerstoffeintrag: 20 bis 120 cm³/(min·l), durch Einblasen oder insbesondere blasenfrei über Sauerstoff-permeable Membranen oder Schläuche, wie z.B. beschrieben in [11].

Erfindungsgemäß brauchbare Elektrodensysteme sind z.B.

- 10 beschrieben in [12] und [13]. Repräsentative, nichtlimitierende Beispiele für geeignete Kathoden-/Anodenpaare sind:
Kohlekathode/Platinanode, wie insbesondere zylinderförmige Kohlekathode (Kohlefilz, Sigraflex®)/Platindrahtanode.

- 15 Die erfindungsgemäß umgesetzten Substrate der Formel II sind allgemein zugängliche Verbindungen und entweder käuflich erhältlich oder mit üblichen Methoden der organischen Chemie herstellbar. Als nicht limitierende Beispiele können genannt werden:

20

2-Hydroxy-C₁-C₆-alkylbenzole, 2-Hydroxy-halogenbenzole, 2-Hydroxybenzonitril, und die 2,5-Dihydroxyanaloga dieser Benzolderivate; 2-Hydroxybiphenyl und mehrfach hydroxylierte Biphenyle, wie z.B. 2,4-, 2,5- oder 2,6-Dihydroxybiphenyl;

- 25 2,n'-Dihydroxybiphenyle (mit n' = 2, 3 oder 4); oder 2,n',m'-Trihydroxybiphenyle (wobei n' und m' voneinander verschieden sind und jeweils für 2, 3 oder 4 stehen).

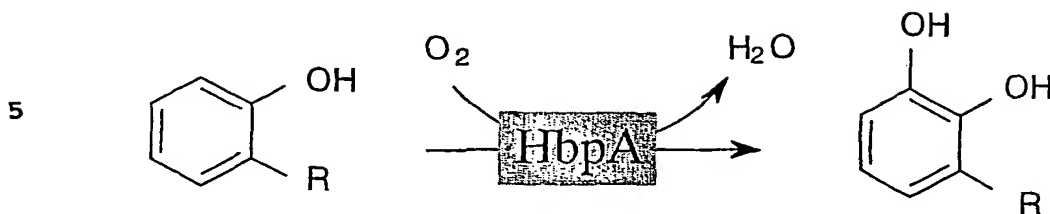
Als Redoxkatalysatoren werden erfindungsgemäß bevorzugt

- 30 [CpRh(bpy)Cl]Cl-Komplexe verwendet. Die Herstellung dieser Komplexe ist allgemein bekannt und erfolgt wie beschrieben in [14] oder [15]. Die nach elektrochemischer Reduktion bei -700 mV (vs. Ag/AgCl_{ges.}) oder aber auch chemisch mit Formiat daraus gebildeten Hydridorhodiumkomplexe überführen NAD(P)⁺ schnell und
35 quantitativ in die enzymaktive 1,4-NAD(P)H-Form. [2,6]

Als repräsentatives Beispiel für brauchbare Enzyme kann, stellvertretend für die Klasse flavinabhängiger Monooxygenasen, die 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase (HbpA, E.C. 1.14.13.44) aus

- 40 P. azelaica, die NADH als Cofaktor benötigt, genannt werden [7]. Das Enzym liegt als Homotetramer mit einer Gesamtmasse von 256 kDa vor und katalysiert entsprechend Schema 1 die selektive ortho-Hydroxylierung einer Reihe α-substituierter Phenolderivate. Auf chemischem Weg ist diese Reaktion mit vergleichbarer
45 Selektivität nicht durchführbar.

Schema 1: Prinzip der HbpA Reaktion



10 Die HbpA-katalysierte Reaktion erfolgt vorzugsweise in einem wässrigen Reaktionsmedium, dessen pH-Wert mit üblichen, die Umsetzung und den elektrochemischen Prozess nicht negativ beeinflussenden Puffersubstanzen, wie z.B. HEPES, PIPES und insbesondere Kaliumphosphat-Puffer und Tris/HCl-Puffer, auf einen
15 geeigneten Wert eingestellt wurde. Die Pufferkonzentration liegt dabei im Bereich von etwa 20 mM bis 0,2 M, insbesondere etwa 20 bis 50 mM. Der pH-Wert wurde bevorzugt auf etwa 6 bis 8, insbesondere etwa 7,5 eingestellt.

20 Das Reaktionsmedium kann weitere übliche Zusätze, wie z.B. Lösungsvermittler für das Substrat, Cofaktoren, wie z.B. FAD oder FMN, für das eingesetzte Enzym, und dergleichen enthalten.

Bei oxidationsempfindlichen Enzymsystemen ist gegebenenfalls die
25 Verwendung von Antioxidantien sinnvoll. Kommt es z.B. verfahrensbedingt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches die Enzymaktivität negativ beeinträchtigen kann, so kann man die Reaktion in Gegenwart von Catalase, z.B. zugesetzt in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ U/l, durchführen.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektrochemischen NAD(P)H-Regeneration, anwendbar bei einer NAD(P)H-verbrauchenden oxidativen enzymatischen Umsetzung eines Substrates, wobei man eine NAD(P)H-verbrauchende oxidative
35 enzymatischen Umsetzung eines oxidierbaren Substrates in Gegenwart von NAD(P)H und vorzugsweise unter Sauerstoff-Verbrauch durchführt, und das bei der Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺ elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert. Dieses Verfahren eignet sich bevorzugt zur Durchführung im Rahmen

40 Monooxygenase-katalysierter Reaktionen. Eine NAD(P)H-abhängige Monooxygenase (aus der Klasse E.C. 1.14.--) wird dabei mit dem oxidierbaren Substrat in Gegenwart von NAD(P)H und in Anwesenheit von Sauerstoff inkubiert und das bei reduktiver Sauerstoffspaltung und Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺
45 elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert.

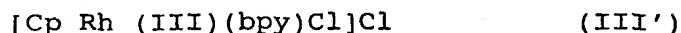
Gemäß einer bevorzugten Verfahrensvariante führt man die elektrochemische NAD(P)⁺-Reduktion in Gegenwart eines vorzugsweise löslichen Hydridorhodium-Redoxkatalysators durch, der kathodisch herstellbar und regenerierbar ist.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren zur NAD(P)H-Regeneration verwendet als Redoxkatalysator vorzugsweise einen Rhodiumkatalysator, der bei einem Kathodenpotenzial im Bereich von -650 bis -800 mV, gemessen gegen Ag/AgCl(gesättigt) (pH=6-9; T=20-60°C, insbesondere
10 etwa 20 bis 35°C, wie z.B. etwa 30°C) elektrochemisch in den Hydridorhodium-Komplex überführbar ist.

Bevorzugt sind beim erfindungsgemäßen Verfahren zur NAD(P)H-Regeneration Rhodium-Komplexe der allgemeinen Formel III'

15



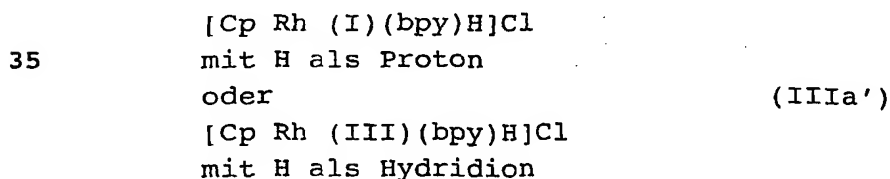
einsetzbar, worin

Cp für Cyclopentadienyl oder Pentamethylcyclopentadienyl steht
20 und

bpy für 2,2'-Bipyridyl steht, wobei jeder der Pyridylringe gegebenenfalls ein- oder mehrfach, insbesondere einfach, durch eine Donorgruppe substituiert ist, wobei die Donorgruppe ausgewählt ist unter Methyl, Methoxy und Acetamido. Weiterhin
25 kann als Donorgruppe ein von Polyethylenglycol, wie z.B. von PEG 2000 bis 20000, abgeleiteter Rest enthalten sein. Bevorzugt kann jeder Pyridylring einen dieser Substituenten in 4- oder 5-Position tragen. Insbesondere sind die Pyridylringe mit gleichen Donorgruppen substituiert.

30

Der Rhodium-Komplex der Formel III' wird kathodisch zu einem Hydridorhodium-Komplex der Formel IIIa'



40 worin Cp und bpy die für Formel III' angegebenen Bedeutungen besitzen, reduziert, welcher zur NAD⁺-Reduktion befähigt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur NAD(P)H-Regeneration wird bevorzugt unter folgenden Verfahrensbedingungen durchgeführt:

45 a) NAD(P)⁺ Konzentration: 0,01 bis 5 mM, insbesondere 0,01 bis 0,5 mM;

- b) Rhodium-Komplex-Konzentration: 1 μM bis 5 mM, insbesondere 5 mM bis 0,5 mM;
- c) Monooxygenase-Konzentration: 1 bis 5000 U/l, insbesondere 10 bis 1000 U/l;
- 5 d) Cofaktor-Konzentration (wie z.B. FAD): 0 bis 200 μM ; , insbesondere 0 bis 20 oder 1 bis 20 μM ;
- e) Catalase-Konzentration: 0 bis $1 \cdot 10^7$ U/l;
- f) pH: 4 bis 9, insbesondere 6 bis 7,5
- g) Temperatur: 10 bis 40°C, insbesondere 20 bis 35°C oder etwa
- 10 30°C;
- h) Kathodenpotenzial: -600 bis -900mV, insbesondere -650 bis -800 mV
- i) Sauerstoffeintrag: Sauerstoffeintrag: 20 bis 120 $\text{cm}^3/(\text{min} \cdot \text{l})$ durch Einblasen oder insbesondere blasenfrei über Sauerstoff-
- 15 permeable Membranen oder Schläuche, wie z.B. beschrieben in [11].

Die erfindungsgemäß umgesetzten Substrate sind allgemein zugängliche Verbindungen und entweder käuflich erhältlich oder
20 mit üblichen Methoden der organischen Chemie herstellbar.

Als Redoxkatalysatoren werden erfindungsgemäß bevorzugt $[\text{CpRh}(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ -Komplexe verwendet. Die Herstellung dieser Komplexe ist allgemein bekannt und erfolgt wie beschrieben in
25 [14] oder [15]. Die nach elektrochemischer Reduktion bei -700 mV (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{ges.}}$) oder aber auch chemisch mit Formiat daraus gebildeten Hydridorhodiumkomplexe überführen NAD(P)^+ schnell und quantitativ in die enzymaktive 1,4-NAD(P)H-Form [2,6].

30 Die Reaktion erfolgt vorzugsweise in einem wässrigen Reaktionsmedium, dessen pH-Wert mit üblichen, die Umsetzung und den elektrochemischen Prozess nicht negativ beeinflussenden Puffersubstanzen, wie z.B. HEPES, PIPES und insbesondere Kaliumphosphat-Puffer und Tris/HCl-Puffer, auf einen geeigneten
35 Wert eingestellt wurde. Die Pufferkonzentration liegt dabei im Bereich von etwa 20 mM bis 0,2 M, insbesondere etwa 20 bis 50 mM. Der pH-Wert wurde bevorzugt auf etwa 6 bis 8, insbesondere etwa 7,5 eingestellt.

40 Das Reaktionsmedium kann weitere übliche Zusätze, wie z.B. Lösungsvermittler für das Substrat, Cofaktoren, wie z.B. FAD oder FMN, für das eingesetzte Enzym, und dergleichen enthalten.

Bei oxidationsempfindlichen Enzymsystemen ist die Verwendung von
45 Antioxidantien sinnvoll. Kommt es z.B. verfahrensbedingt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches die Enzymaktivität negativ beeinträchtigen kann, so kann man die Reaktion in

Gegenwart von Catalase, z.B. zugesetzt in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ U/l, durchführen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur NAD(P)H-Regeneration ist
5 bevorzugt einsetzbar für die folgenden, eine oxidative
enzymatische Umsetzung umfassenden Reaktionstypen:

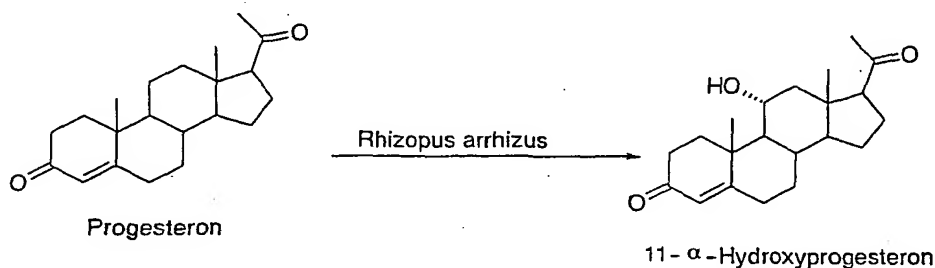
- a) Oxidation an gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen
oder aromatischen Kohlenstoffatomen, insbesondere durch Hydroxylierung, Epoxidierung und Baeyer-Villinger-Oxidation;
- 10 b) Schwefel- oder Selen-Oxidation;
- c) Stickstoff- oder Phosphor-Oxidation;
- d) Oxidation von Halogeniden.

Nichtlimitierende Beispiele für Reaktionstyp a):

15

- (1) Hydroxylierung am aliphatischen Kohlenstoff:

20



25

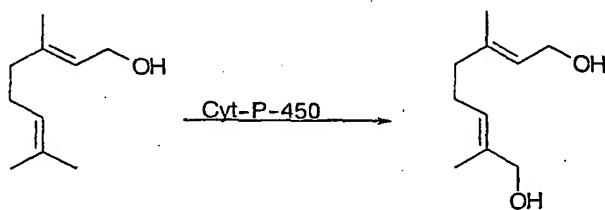
z.B. beschrieben in JP 75/54957 (Takeda)

- 30 (2) ω-Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren, katalysiert durch
Cytochrom P450-Monooxygenase; z.B. beschrieben in der
DE-A-199 35 115.5 (BASF AG)

- (3) Hydroxylierung allylischer oder benzyllischer Kohlenstoffatome

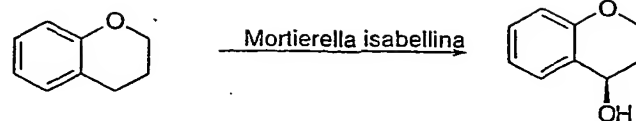
35

40



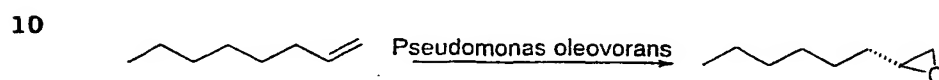
H. Fretz, W. D. Woggon, R. Voges *Hel. Chim. Acta*, 1989., 72, 391-400

45



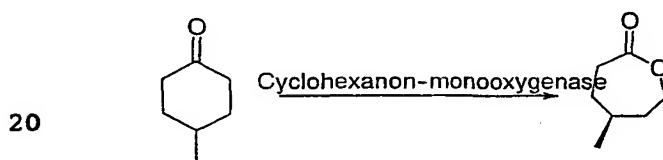
5 H. L. Holland, T. S. Manoharan, F. Schweizer *Tetrahedron : Asymmetry*, 1991, 2, 335-338

(4) Epoxidierung:



S. W. May, B. J. Abbot *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 1725-1730

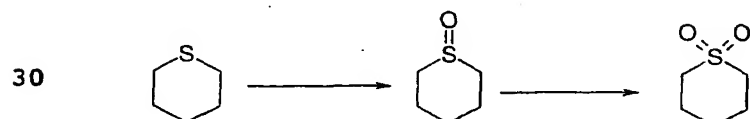
15 (5) Baeyer-Villinger-Oxidation:



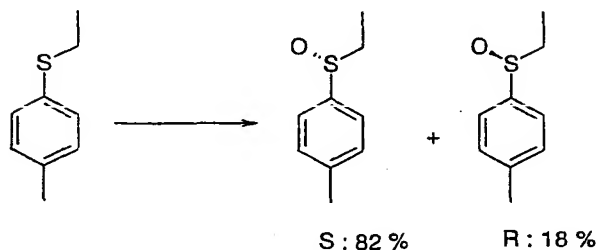
Roberts et al. *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, 1998, 4, 111 ff

25

(5) Heteroaromatenoxidation:



35



S : 82 % R : 18 %

40



95 % ee

45

WO 01/88172

jeweils katalysiert durch Cyclohexanon-Monooxygenase; beschrieben von Walsh, C.T., et al Angew. Chem., 1988, 100, 242; und Roberts, et al., J. Mol. Cat. B Enzymatic, 1998, 4, 111.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung eines Redoxkatalysators gemäß obiger Definition zur kontinuierlichen oder diskontinuierlichen elektrochemischen Regenerierung von NAD(P)H, bevorzugte bei Sauerstoff verbrauchenden, insbesondere bei Monooxygenase-katalysierten Oxidationsreaktionen, insbesondere Oxidationsreaktionen des oben bezeichneten Typs.

- Schließlich betrifft die vorliegende Bioreaktoren zur kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Durchführung Sauerstoff verbrauchender, insbesondere Monooxygenase-katalysierter Reaktionen, umfassend in einem Reaktionsraum ein Elektrodenpaar sowie ein flüssiges, ein- oder zweiphasiges Reaktionsmedium, welches ein Redoxkatalysator jeweils Substrat, NAD(P)H-Kofaktor und eine Redoxkatalysator jeweils gemäß obiger Definition enthält, wobei an der Kathode ein Redoxäquivalenten (Elektronen) auf den Redoxkatalysator geeignet ist.

- 20 Bioreaktoren geeigneten Typs sind z.B. beschrieben in [16] und 25 [17], worauf hiermit Bezug genommen wird.

- Der Betrieb des Reaktors und die Verfahrensführung können vom Fachmann den jeweiligen Erfordernissen der gewünschten Redoxreaktion angepaßt werden. Ein- oder zweiphasige Reaktionsmedien sind ebenfalls anwendbar wie eine 30 Reaktionsmedien des Reaktionsraums. Zweiphasige Reaktionsmedien sind z.B. vorteilhaft bei Umsetzung von Substraten und/oder Bildung von Produkten, welche im wässrigen Reaktionsmedium nicht oder nur schlecht löslich sind. Dieses wird man z.B. Substrat in der wässrigen Phase vorlegen, dort umgesetzt und das gebildete Produkt gegebenenfalls wieder an die organische Phase abgegeben. Eine Kompartimentierung erlaubt beispielsweise 35 kontinuierlich in die wässrige Phase abzugeben, dort umgesetzt und das gebildete Produkt gegebenenfalls wieder an die organische Phase abgegeben. Eine Kompartimentierung erlaubt beispielsweise eine räumliche und zeitliche Trennung von Enzymreaktion und 40 Elektrodenreaktion. Bevorzugt ist außerdem ein Sauerstoffeintrag durch Begasung, insbesondere blasenfreie Begasung, wie z.B. beschrieben von Rissom in [4b], worauf hiermit Bezug genommen wird.

- 45 Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

Figur 1 eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen elektroenzymatischen Prozesses der Bildung von 2,3-Dihydroxybiphenyl unter gleichzeitiger elektrochemischer NADH-Regeneration; dabei wird kathodisch der Hydridorhodium(III)-Redoxkatalysator gebildet und regeneriert. Nach Übertragung des Hydridions auf NAD^+ und Bildung von NADH reduziert dieses die Monooxygenase, wie z.B. die prosthetische FAD-Gruppe der 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase, zur aktiven FADH_2 -Funktion. Diese reduzierte Form des Enzyms katalysiert dann in Gegenwart von Sauerstoff die Oxygenierung des Substrates, wie z.B. von 2-Hydroxybiphenyl zu 2,3-Dihydroxybiphenyl.

Figur 2 den Einfluß von O_2 auf die NADH-Bildung unter indirekt elektrochemischer Regeneration (■ ohne Drucklufteintrag; ○ mit Drucklufteintrag von $10 \text{ cm}^3/\text{min}$)

Figur 3 den postulierten Mechanismus der Hydridoxidation

Figur 4 den Einfluß des Sauerstoffgehaltes auf die Bildung von 2,3-Dihydroxybiphenyl unter indirekter elektrochemischer Cofaktorregenerierung (○: kein Sauerstoffeintrag in die Lösung; ■: nach 1h einsetzender Sauerstoffeintrag)

Figur 5 einen Vergleich der Umsatzgeschwindigkeit unter chemischer und indirekt-elektrochemischer Hydridorhodiumbildung (○: redoxkatalytische, chemische Regeneration mit Formiat als Reduktionsmittel; ■: indirekte elektrochemische Regeneration)

Figur 6 in schematischer Darstellung einen geeigneten Batchreaktor, umfassend ein Reaktionsgefäß mit Rührer, Ringkathode, mittig angeordneter Anode, Referenzelektrode, Druckluftzufuhr in das Reaktionsmedium.

Beispiel 1: Elektroenzymatische Oxidation von 2-Hydroxybiphenyl zu 2,3-Dihydroxybiphenyl

Entsprechend Figur 1 wird die elektroenzymatische Umsetzung in einer Batch-Elektrolysezelle, schematisch dargestellt in Figur 6, durchgeführt. Als Kathode dient hierbei eine zylindrische Kohlefilzelektrode (Volumen ca. 27 cm^3). Durch Ummantelung der Platin-Gegenelektrode mit einem Dialyseschlauch (Ausschlußgewicht 10 kDa) werden die Bedingungen einer geteilten Zelle erreicht.

Das Kathodenpotenzial von -750 mV wird gegen eine $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{ges.}}$ -Schlauchelektrode eingestellt. In 100 ml KP_i -Puffer (50 mM , $\text{pH } 7.5$) sind der oxidierte Cofaktor NAD^+ (0.2 mM),

[Cp*Rh(bpy)Cl]²⁺ (0.1 mM), FAD (20 µM), Catalase (250000 U), Hbpa (19 U) sowie das Substrat (2 mM) gelöst. Die Umsetzung erfolgt bei T=30°C und über einen Zeitraum von 5 Stunden.

- 5 Der Reaktionsfortschritt wird mittels HPLC-Chromatographie an einer RP-18-Säule mit Methanol/Wasser (0.1% H₃PO₄) 60:40 als Eluens verfolgt.

Beispiel 2: Einfluß von gelöstem Sauerstoff auf die

10 NADH-Regeneration

Da Sauerstoff ein Bestandteil der Reaktionssequenz ist, muß der Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die Komponenten des Systems untersucht werden. Dabei zeigt sich, daß Sauerstoff die

- 15 NADH-Erzeugung sowohl durch den chemisch mit Formiat als auch durch den erfindungsgemäß auf elektrochemischem Weg gebildeten Hydridorhodiumkomplex inhibiert (Figur 2). Wie aus Figur 2 deutlich wird, geht bei einem Sauerstoffeintrag von beispielsweise 10 cm³/min die NADH-Bildungsgeschwindigkeit von
- 20 1.1 mmol/l.h auf 0.27 mmol/l.h zurück. Bei einem Eintrag von 15 cm³/min ist keine NADH-Bildung mehr nachweisbar. Die Inhibierung ist jedoch reversibel, da nach Unterbrechung des Sauerstoffstromes die NADH-Bildungsgeschwindigkeit fast wieder ihren optimalen Wert erreicht. Ebenso erreicht die
- 25 NADH-Konzentration ihren Maximalwert. Als Produkt der Reaktion des Hydridorhodiumkomplexes mit molekularem Sauerstoff konnte Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden, dessen Bildung wie in Figur 3 angegeben denkbar ist. Darüber hinaus wird Wasserstoffperoxid bei dem anliegenden Potential auch durch
- 30 direkte Reduktion des Sauerstoffs an der Kathode gebildet. Daher ist es zweckmäßig Catalase zuzusetzen, da diese während der enzymatischen Umsetzung Wasserstoffperoxid zerstört.

Beispiel 3: Einfluß von Sauerstoffzufuhr auf den Umsatz

35

Die Ergebnisse in Figur 4 zeigen, daß der Umsatz bei Reaktionen ohne externe Sauerstoffzuführung nach kurzer Zeit bei ca. 20% stagniert (offene Kreise bzw. gefüllte Quadrate bis ca. 1h). Mit nach 1h einsetzender Sauerstoffzufuhr (8 cm³/min) steigt die

- 40 Umsatzgeschwindigkeit und damit die Produktbildung bis zu einem Wert von 1.1 mmol/l.h (202 mg/l.h) an. Die vom Mediator erbrachten Wechselzahlen liegen hierbei bei 11 h⁻¹. Ähnliche Werte werden erreicht, wenn der Hydridorhodiumkomplex chemisch mit Natriumformiat erzeugt wird. In Figur 5 sind die
- 45 Umsatzgeschwindigkeiten für die indirekte elektrochemische Cofaktorregenerierung unter den genannten Bedingungen, jedoch unter einem ständigen Sauerstoffeintrag von 10 cm³/min und für den

durch Formiat ($c(\text{NaHCO}_2) = 160 \text{ mM}$; ansonsten gleiche Bedingungen) getriebenen redoxkatalytischen Prozess dargestellt. Die Produktivität liegt bei ca. 50% des bereits optimierten fermentativen bzw. des in vitro-Verfahrens unter enzymgekoppelter
5 NADH-Regeneration (390 mg/l.h) [8].

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht durch die Bildung des Hydridorhodiumkomplexes an der Kathode limitiert, sondern durch die kompetitive Hemmung des Redoxkatalysators durch die
10 Konkurrenzreaktion mit molekularem Sauerstoff (Figur 4).

In dem erfindungsgemäßen kontinuierlichen elektroenzymatischen Verfahren sollte sich der negative Einfluß des gelösten Sauerstoffs auf die indirekt elektrochemische NADH-Regeneration
15 leicht durch eine Kompartimentierung des Gesamtsystems in einzelne Module ausschalten lassen. Durch die räumlich und zeitlich auf den elektrochemischen Schritt folgende Zudosierung des für die Enzymreaktion unabdingbaren Sauerstoffs wird dessen inhibitorischer Effekt auf die NADH-Regenerierung minimiert.

20 Die Langzeitstabilität der durchgeführten Batchelektrolysen kann durch Verringerung der denaturierenden Wirkung der nicht-blasenfreien Begasung verbessert werden. An der Phasengrenze flüssig/gasförmig treten nämlich starke Scherkräfte
25 auf, die mittelfristig zur Enzymdenaturierung führen. In Vergleichsexperimenten konnte gezeigt werden, daß HbPA bei Thermostatisierung bei 30°C und Rühren ($u = 250 \text{ min}^{-1}$) auch nach 12 h noch mehr als 85% ihrer Initialaktivität besitzt. Mit einsetzender Druckluftzufuhr nimmt diese in Abhängigkeit von der
30 Zufuhrgeschwindigkeit um bis zu 70% innerhalb einer Stunde ab. Durch Verwendung eines Enzym-Membran-Reaktors [9] können das Produktionsenzym vor dem negativen Einfluß des heterogenen Sauerstoffeintrages geschützt und folglich hohe Prozeßlaufzeiten erreicht werden. Insbesondere durch Anwendung einer zweiphasigen
35 Reaktionsführung und der resultierenden in situ Zudosierung des Substrates und Extraktion des Catecholproduktes sollte ein effektiver kontinuierlicher Prozeß verwirklicht sein.

Erfindungsgemäß konnte erstmalig eine durch eine flavinabhängige
40 Monooxygenase katalysierte Umsetzung unter indirekt elektrochemischer NADH-Regeneration erfolgreich durchführen.

Die vorliegende Erfindung schafft die Grundlage für die Einbindung von Monooxygenasen in organische Synthesen sowohl im
45 Labormaßstab, als auch in der industriellen Anwendung. Diese Klasse oxidierender Enzyme ist synthetisch hoch interessant, da sie beispielsweise Hydroxyfunktionen in aromatische Systeme und

16

auch in nicht aktivierte reine Kohlenwasserstoffe einführen können. Sie können außerdem Sauerstoff auf Heteroatome oder auf Doppelbindungen unter Bildung von Epoxiden übertragen. Zusätzlich katalysieren sie Baeyer-Villiger-Oxidationen. In allen Fällen
5 sind enantiomerenreine Produkte zugänglich.

Das zugrundeliegende elektrochemische NAD(P)H-Regenerationskonzept stellt eine effektive und einfach anwendbare Alternative zu den bisherigen in vivo-Verfahren bzw.
10 solchen Verfahren, die sich eines enzymatischen Regenerationsystems bedienen, dar. Die allgemeine Anwendbarkeit, auch unter den Umsatzbedingungen sauerstoffabhängiger Monooxygenasen, konnte belegt werden.

15

20

25

30

35

40

45

Literaturverzeichnis

- [1] a) Hummel, W., et al., Eur. J. Biochem. 1989, 184, 1-13; b)
5 Shaked, Z., et al., J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7104-7108;
c) Abril, O., et al., Bioorg. Chem. 1989, 17, 41-52; d) Seel-
bach, K., et al., Tetrahedron Lett. 1996, 37, 1377-1380
- [2] a) Hilt, G., et al., Liebigs Ann./Recueil 1997, 2289-2296; b)
10 Westerhausen, D., et al., Angew. Chem. 1992, 104, 1496-1498;
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 1529 - 1531 c) Ruppert,
R., et al Tetrahedron Lett. 1987, 52(28), 6583-6586
- [3] a) Walsh, C.T. Acc. Chem. Res. 1980, 13, 148-155; b) Walsh,
15 C.T. et al., Angew. Chem. 1988, 100, 342-352; Angew. Chem.
Int. Ed. Engl. 1988
- [4] a) Hummel, W., et al.; Appl. Microbiol Biotechnol. 1986, 25,
175-185; b) Rissom, R., et al., Tetrahedron Asymmetry 1997,
20 15(8), 2523-2526
- [5] Wong, C.-H., et al., J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 4890-4899
- [6] a) Steckhan, E., et al., Organometallics, 1991, 10,
25 1568-1577; b) Ruppert, R., et al., J. Chem. Soc., Chem. Com-
mun., 1988, 1150-1151
- [7] Suske, W. A., et al., J. Biol. Chem., 1997, 272 (39),
24257-242565
30
- [8] Held, M., et al., Biotechnol. Bioeng., 1999, 62 (6), 641-648
- [9] Wandrey, C., Chem. Ing. Tech. 1976, 48, 537
- 35 [10] Reipa, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94,
13554-13558
- [11] Schneider et al., Enzyme Microbiol. Technol., 1995, 17, 839
- 40 [12] Sawyer, D.T., Electrochemistry for Chemists, 2. Aufl, Wiley-
Interscience; New York
- [13] Kissinger, P. T., Laboratory Techniques in Electroanalytical
Chemistry, Marcel Dekker, Inc.; New York/ Basel
45
- [14] Kölle, U., et al., Angew. Chem. 1987, 99, 572

[15] Kölle, U., et al., Chem.Ber. 1989, 122, 1869

[16] Kragl, U., et al., Chem. Ing. Tech., 1992, 499

5 [17] Brielbeck, B., et al., Biocatalysis, 1994, 10, 49

10

15

20

25

30

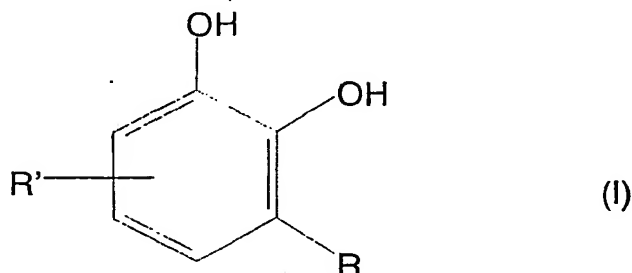
35

40

45

Patentansprüche

- 5 1. Elektroenzymatisches Verfahren zur Herstellung von 2,3-Dihydroxyphenylderivaten der allgemeinen Formel I



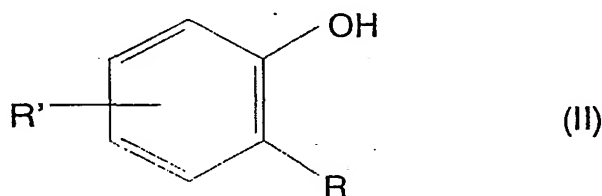
worin

R für gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiertes Phenyl, C₁-C₆-Alkyl, Halogen oder CN steht; und

20 R' für H oder OH steht;

dadurch gekennzeichnet, dass man

- 25 a) eine Monohydroxyphenyl-Verbindung der allgemeinen Formel II



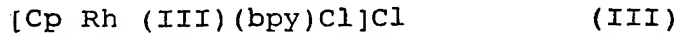
worin R und R' die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, mit 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase (HbpA) (E.C.1.14.13.44) in Gegenwart von NADH und Sauerstoff umgesetzt; und

- b) das gebildete NAD⁺ elektrochemisch zu NADH reduziert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die elektrochemische NAD⁺-Reduktion in Gegenwart eines Hydri-
 40 dorhodium-Redoxkatalysators durchführt, der kathodisch herstellbar und regenerierbar ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Redoxkatalysator einen Rhodiumkomplex verwendet, der bei
 45 einem Kathodenpotenzial im Bereich von -650 bis -800 mV, ge-

messen gegen Ag/AgCl(gesättigt) (pH=6-9; T=20-30°C) elektrochemisch in den Hydridorhodium-Komplex überführbar ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man
5 einen Rhodium-Komplex der allgemeinen Formel III



einsetzt, worin

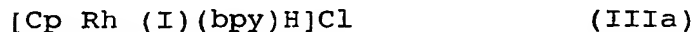
10

Cp für Cyclopentadienyl oder Pentamethylcyclopentadienyl
steht und

15

bpy für 2,2'-Bipyridyl steht, wobei jeder der Pyridylringe
gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch eine Donorgruppe
substituiert ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der
Rhodium-Komplex der Formel III kathodisch zu einem Hydridor-
20 hodium-Komplex der Formel IIIa



reduziert wird, welcher zur NAD⁺-Reduktion befähigt ist.

25

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
zeichnet, dass es unter folgenden Verfahrensbedingungen
durchgeführt wird:

30

- a) Substratkonzentration: 0,1 bis 4 mM;
- b) NAD⁺ Konzentration: 0,01 bis 0,5 mM;
- c) Rhodium-Komplex-Konzentration: 5 µM bis 0,5 mM;
- d) HbpA-Konzentration: 10 bis 1000 U/l;
- e) FAD-Konzentration: 0 bis 200 µM;
- 35 f) Catalase-Konzentration: 0 bis 1·10⁷ U/l;
- g) pH: 6 bis 7,5
- h) Temperatur: 20 bis 30°C
- i) Kathodenpotenzial: -650 bis -800 mV
- j) Sauerstoffeintrag: 20 bis 120 cm³/(min·l)

40

7. Verfahren zur elektrochemischen NAD(P)H-Regeneration aus en-
zymatisch gebildetem NAD(P)⁺

dadurch gekennzeichnet, dass man

45

eine NAD(P)H-verbrauchende oxidative enzymatische Umsetzung eines oxidierbaren Substrates in Gegenwart von NAD(P)H durchführt, und das bei der Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺ elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert.

- 5
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man eine NAD(P)H-abhängige Monooxygenase (aus der Klasse E.C. 1.14.--.) mit dem oxidierbaren Substrat in Gegenwart von NAD(P)H und in Anwesenheit von Sauerstoff inkubiert und das
- 10 bei reduktiver Sauerstoffspaltung und Oxidation des Substrats gebildete NAD(P)⁺ elektrochemisch zu NAD(P)H reduziert.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die elektrochemische NAD(P)⁺-Reduktion in Gegenwart eines Hydridorhodium-Redoxkatalysators durchführt, der kathodisch
- 15 herstellbar und regenerierbar ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als Redoxkatalysator einen Rhodiumkatalysator verwendet, der bei einem Kathodenpotenzial im Bereich von -650 bis -800 mV, gemessen gegen Ag/AgCl(gesättigt) (pH = 6-9; T = 20-35°C) elektrochemisch in den Hydridorhodium-Komplex überführbar
- 20 ist.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Rhodium-Komplex der allgemeinen Formel III
- $$[\text{Cp Rh (III)(bpy)Cl}] \text{Cl} \quad (\text{III})$$
- 30 einsetzt, worin
- Cp für Cyclopentadienyl oder Pentamethylcyclopentadienyl steht und
- 35 bpy für 2,2'-Bipyridyl steht, wobei jeder der Pyridylringe gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch eine Donorgruppe substituiert ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Rhodium-Komplex der Formel III kathodisch zu einem Hydridorhodium-Komplex der Formel IIIa
- 40
- $$[\text{Cp Rh (I)(bpy)H}] \text{Cl} \quad (\text{IIIa})$$
- 45 reduziert wird, welcher zur NAD⁺-Reduktion befähigt ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass es unter folgenden Verfahrensbedingungen durchgeführt wird:
- 5 a) NAD(P)⁺ Konzentration: 10 µM bis 0,5 mM;
 - b) Rhodium-Komplex-Konzentration: 5 mM bis 0,5 mM;
 - c) Monooxygenase-Konzentration: 10 bis 1000 U/l;
 - d) FAD-Konzentration: 0 bis 200 µM;
 - e) Catalase-Konzentration: 0 bis 1·10⁷ U/l;
 - 10 f) pH: 5 bis 9
 - g) Temperatur: 20 bis 35°C
 - h) Kathodenpotenzial: -650 bis -800 mV
 - i) Sauerstoffeintrag: Sauerstoffeintrag: 20 bis 120 cm³/min·l
- 15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die oxidative enzymatische Umsetzung einen der folgenden Reaktionstypen umfasst:
- 20 a) Oxidation an gesättigten oder ungesättigten aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatomen, insbesondere durch Hydroxylierung, Epoxidierung und Baeyer-Villinger-Oxidation;
 - b) Schwefel- oder Selen-Oxidation;
 - c) Stickstoff- oder Phosphor-Oxidation;
 - 25 d) Oxidation von Halogeniden.
15. Verwendung eines Redoxkatalysators gemäß der Definition in einem der Ansprüche 9 bis 12 zur kontinuierlichen oder diskontinuierlichen elektrochemischen Regenerierung von NAD(P)H bei Monooxygenase-katalysierten Oxidationsreaktionen.
- 30 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die Oxidationsreaktion ausgewählt ist unter:
- 35 a) Oxidation an gesättigten oder ungesättigten aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatomen, insbesondere durch Hydroxylierung, Epoxidierung und Baeyer-Villinger-Oxidation;
 - b) Schwefel- oder Selen-Oxidation;
 - 40 c) Stickstoff- oder Phosphor-Oxidation;
 - d) Oxidation von Halogeniden.
17. Bioreaktor, zur kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Durchführung Monooxygenase-katalysierter elektroenzymatischer Reaktionen, umfassend in einem Reaktionsraum ein Elektrodenpaar sowie ein flüssiges Reaktionsmedium, welches Monooxygenase, Substrat, NAD(P)H-Kofaktor und eine Redoxkatalysator
- 45

23

gemäß der Definition in einem der Ansprüche 2 bis 5 enthält, wobei an der Kathode ein Elektrodenpotential anliegt, welches zur Übertragung von Redoxäquivalenten (Elektronen) auf den Redoxkatalysator geeignet ist.

5

18. Bioreaktor nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das flüssige Reaktionsmedium ein- oder zweiphasig ist.

10

15

20

25

30

35

40

45

1/6

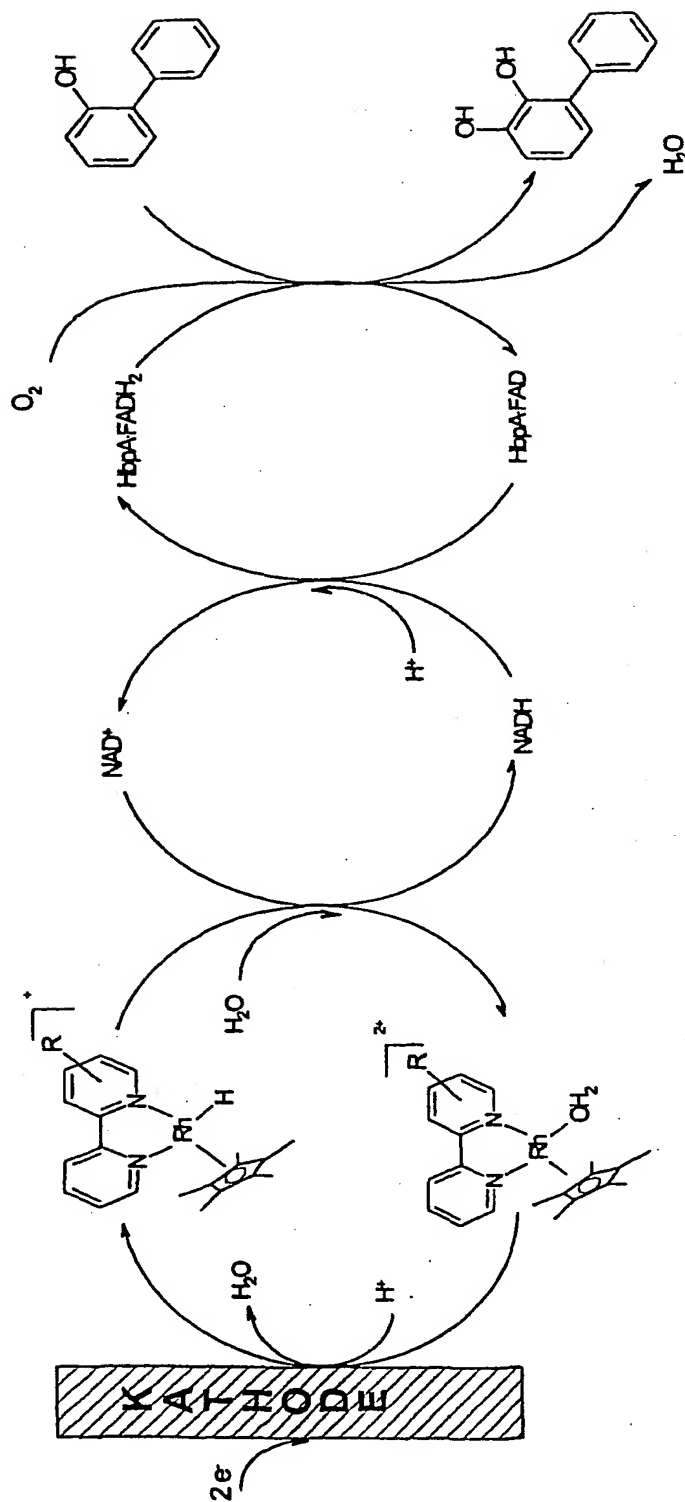


FIG. 1

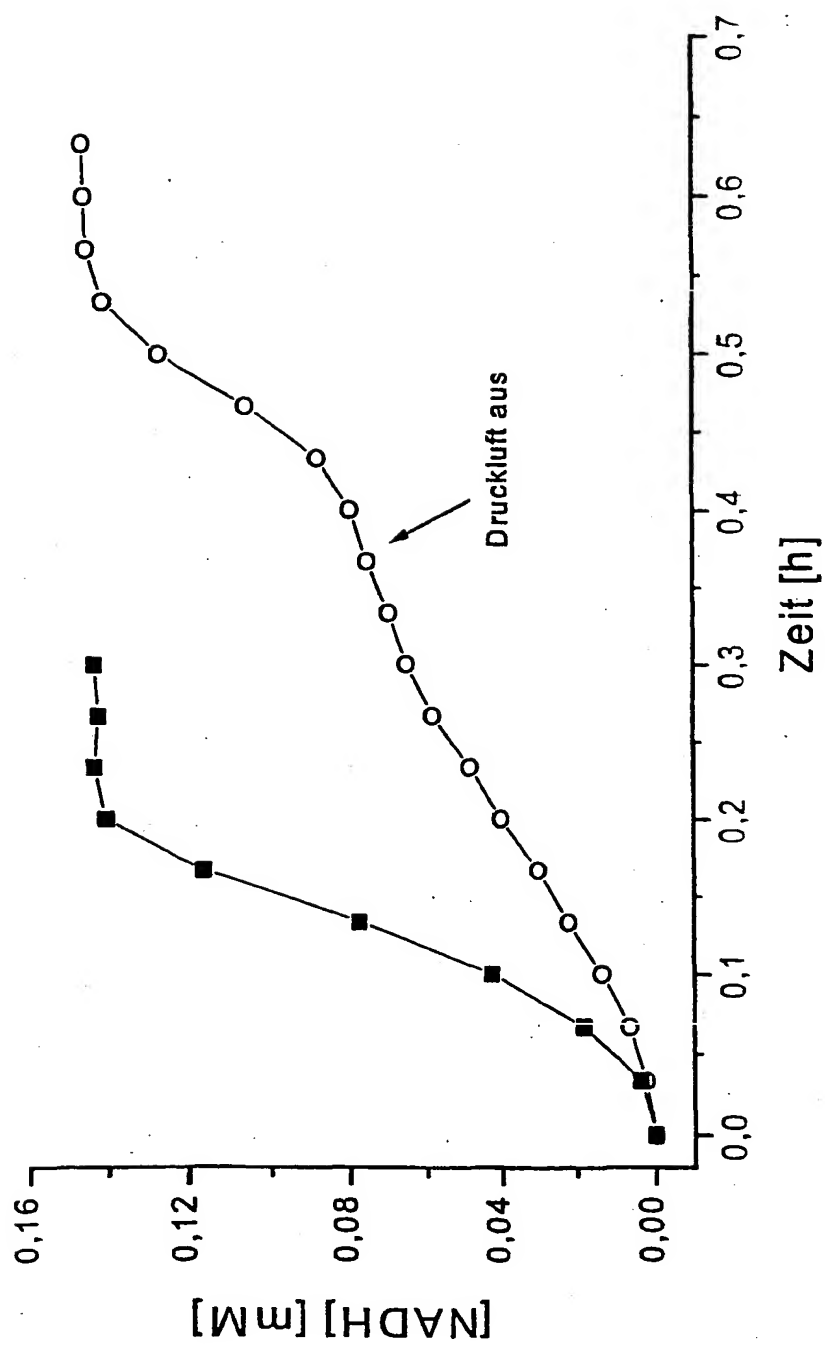


FIG. 2

3/6

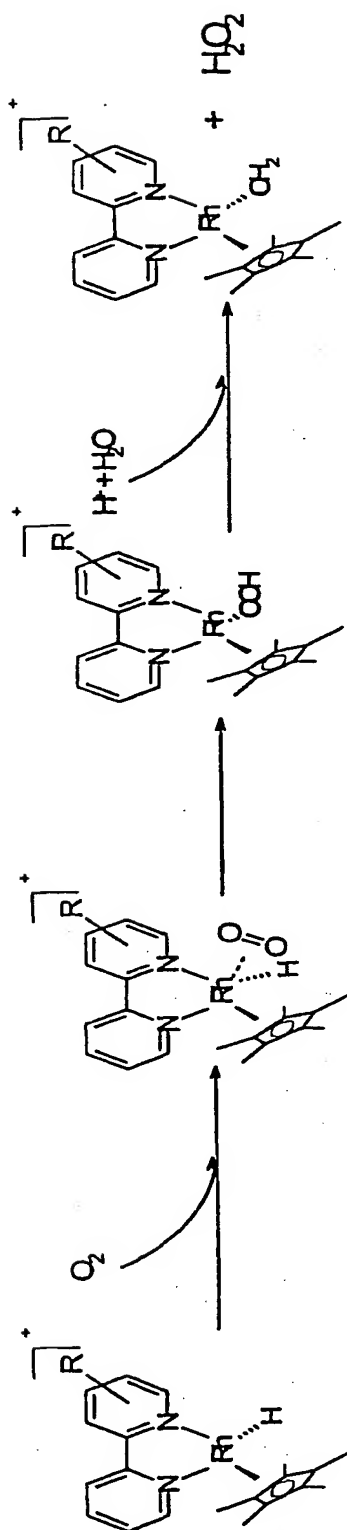


FIG. 3

4/6

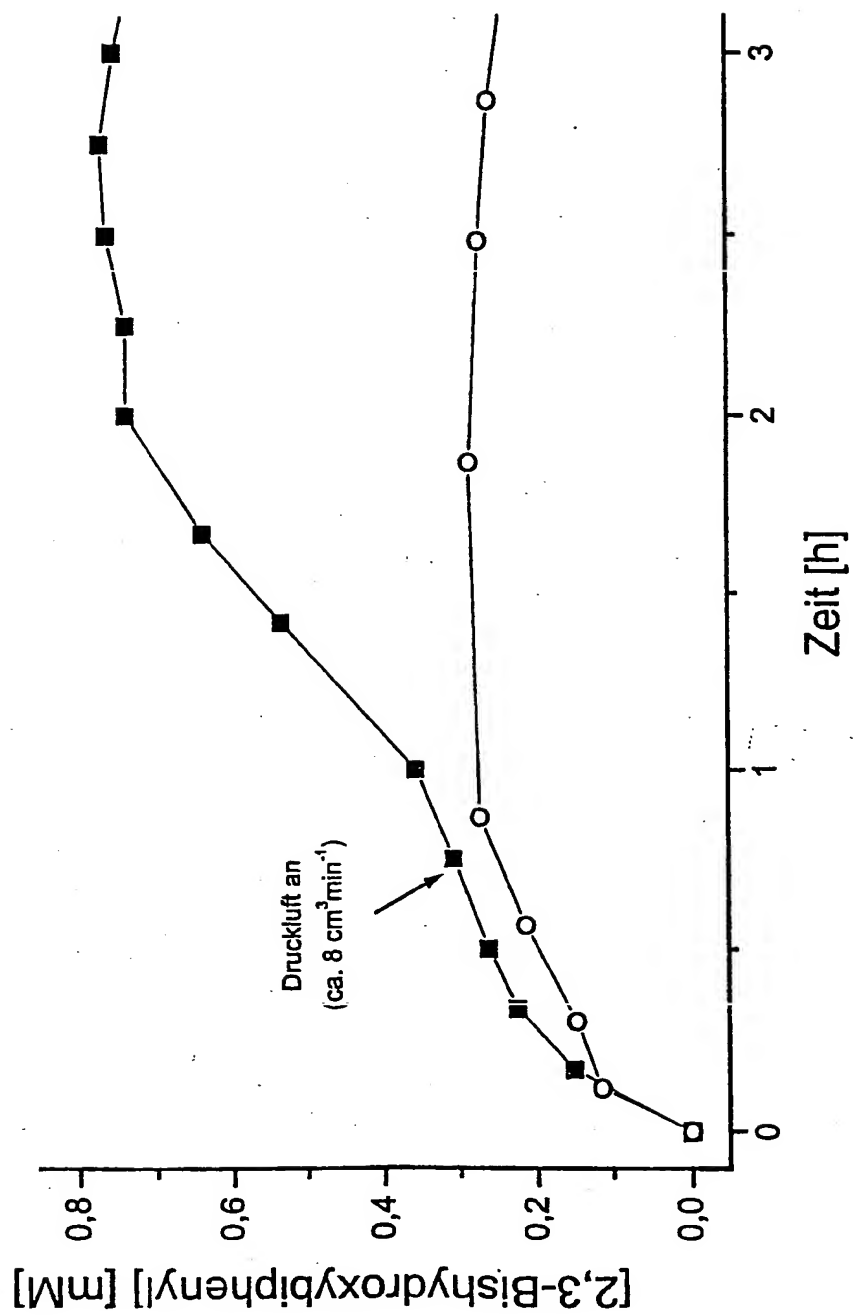


FIG. 4

5/6

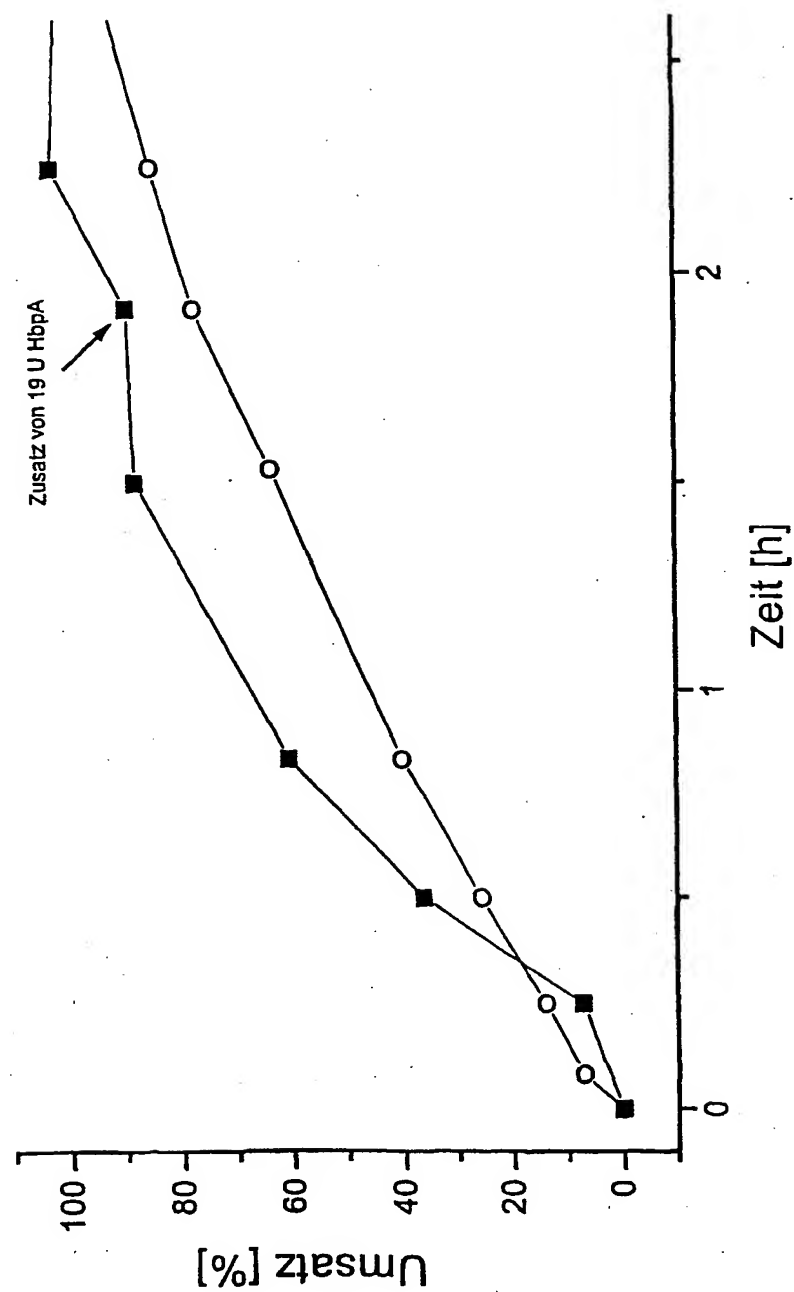


FIG. 5

6/6

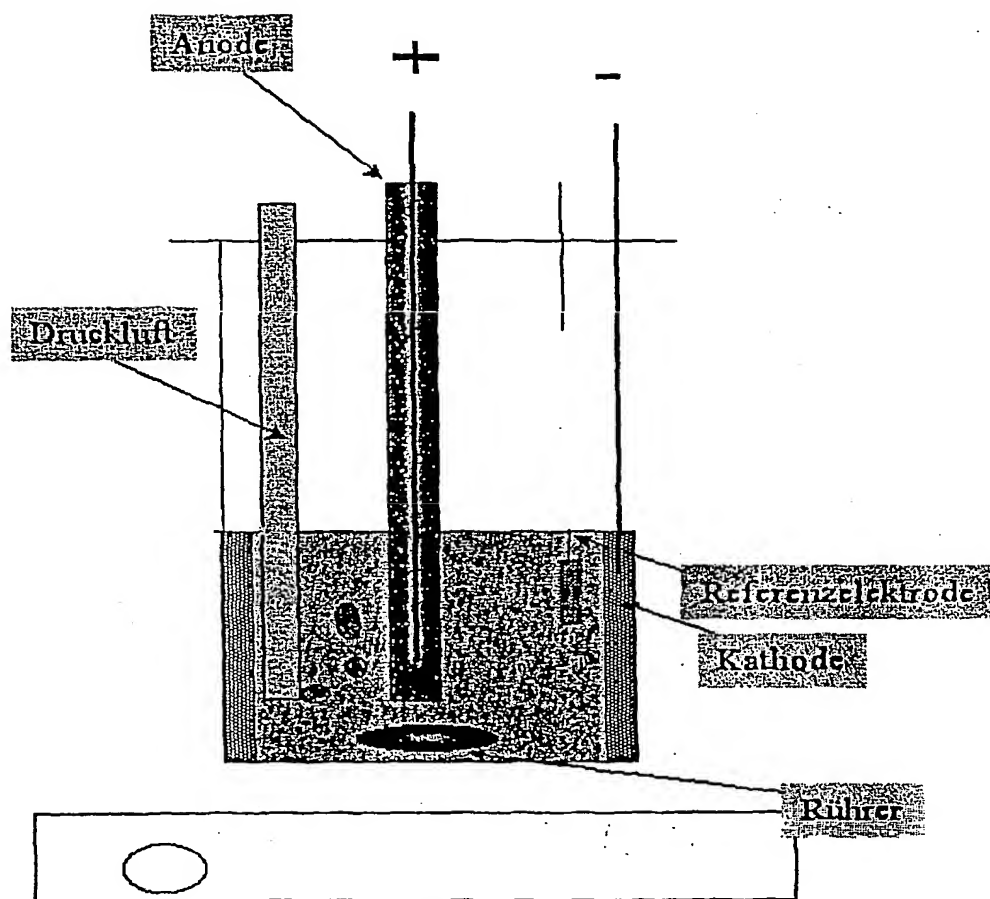


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/EP 01/05601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P1/00 C25B3/04 C25B9/00 C12M1/00 C12P7/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C25B C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HOLLMANN, FRANK ET AL: "The first synthetic application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration" retrieved from STN Database accession no. 134:262715 XP002175630 abstract & ANGEW. CHEM., INT. ED. (2001), 40(1), 169-171 , -/-	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2001

Date of mailing of the international search report

06/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/EP 01/05601

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	US 6 126 795 A (THE USA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF COMMERCE) 3 October 2000 (2000-10-03) column 1 -column 2; claims 1-39 ----	1-18
X	EP 0 099 517 A (BASF AG) 1 February 1984 (1984-02-01) the whole document ----	1-18
X	EP 0 096 288 A (BASF AG) 21 December 1983 (1983-12-21) the whole document ----	1-18
X	EP 0 747 984 A (BAYER CORP.) 11 December 1996 (1996-12-11) page 2 -page 3; claims 1-10 ----	1-18
X	REIPA V. ET AL.: "A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysts" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 94, 1997, pages 13554-13558, XP001019007 cited in the application the whole document ----	1-18
X	HELD M. ET AL.: "An Integrated Process for the Production of Toxic Catechols from Toxic Phenols Based on a Designer Biocatalyst" BIOTECH. BIOENG., vol. 62, no. 6, 1999, pages 641-648, XP001019008 cited in the application the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: Application No

PCT/EP 01/05601

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6126795	A	03-10-2000	NONE	
EP 0099517	A	01-02-1984	DE 3226888 A	19-01-1984
			AT 23879 T	15-12-1986
			CA 1202923 A	08-04-1986
			DE 3367935 D	15-01-1987
			DK 327183 A,B,	18-01-1984
			FI 832592 A,B,	18-01-1984
			JP 1908924 C	24-02-1995
			JP 6038751 B	25-05-1994
			JP 59059192 A	04-04-1984
			US 4464235 A	07-08-1984
EP 0096288	A	21-12-1983	DE 3221339 A	08-12-1983
			DE 3360607 D	26-09-1985
			US 4526661 A	02-07-1985
EP 0747984	A	11-12-1996	US 5520786 A	28-05-1996
			AU 692387 B	04-06-1998
			AU 5475096 A	19-12-1996
			CA 2177753 A	07-12-1996
			JP 8334490 A	17-12-1996

PCT/EP 01/05601

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12P1/00	C25B3/04 C25B9/00 C12M1/00 C12P7/22
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 C12P C25B C12M		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HOLLMANN, FRANK ET AL: "The first synthetic application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration" retrieved from STN Database accession no. 134:262715 XP002175630 Zusammenfassung & ANGEW. CHEM., INT. ED. (2001), 40(1), 169-171 ,</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
23. August 2001		06/09/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde		Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Douschan, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	US 6 126 795 A (THE USA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF COMMERCE) 3. Oktober 2000 (2000-10-03) Spalte 1 -Spalte 2; Ansprüche 1-39 ----	1-18
X	EP 0 099 517 A (BASF AG) 1. Februar 1984 (1984-02-01) das ganze Dokument ----	1-18
X	EP 0 096 288 A (BASF AG) 21. Dezember 1983 (1983-12-21) das ganze Dokument ----	1-18
X	EP 0 747 984 A (BAYER CORP.) 11. Dezember 1996 (1996-12-11) Seite 2 -Seite 3; Ansprüche 1-10 ----	1-18
X	REIPA V. ET AL.: "A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysts" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 94, 1997, Seiten 13554-13558, XP001019007 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-18
X	HELD M. ET AL.: "An Integrated Process for the Production of Toxic Catechols from Toxic Phenols Based on a Designer Biocatalyst" BIOTECH. BIOENG., Bd. 62, Nr. 6, 1999, Seiten 641-648, XP001019008 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. : Aktenzeichen

PCT/EP 01/05601

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6126795	A	03-10-2000	KEINE		
EP 0099517	A	01-02-1984	DE	3226888 A	19-01-1984
			AT	23879 T	15-12-1986
			CA	1202923 A	08-04-1986
			DE	3367935 D	15-01-1987
			DK	327183 A,B,	18-01-1984
			FI	832592 A,B,	18-01-1984
			JP	1908924 C	24-02-1995
			JP	6038751 B	25-05-1994
			JP	59059192 A	04-04-1984
			US	4464235 A	07-08-1984
EP 0096288	A	21-12-1983	DE	3221339 A	08-12-1983
			DE	3360607 D	26-09-1985
			US	4526661 A	02-07-1985
EP 0747984	A	11-12-1996	US	5520786 A	28-05-1996
			AU	692387 B	04-06-1998
			AU	5475096 A	19-12-1996
			CA	2177753 A	07-12-1996
			JP	8334490 A	17-12-1996